

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
26. September 2002 (26.09.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/074987 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/03180

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. März 2002 (21.03.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 13 876.8 21. März 2001 (21.03.2001) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **LANG, Florian** [DE/DE]; Im Rotbad 52, 72076
Tübingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BUSJAHN, Andreas**
[DE/DE]; Charité Universitätsklinikum, Med. Fakultät
Humboldt-Universität Berlin, Schumannstr. 21/22, 10117
Berlin (DE). **LUFT, Friedrich, C.** [DE/DE]; Franz Vol-
hard Klinik, Wiltberg Strasse 50, 13125 Berlin (DE).

(74) Anwalt: **ISENBRUCK, Günter**; Bardehle, Pa-
genberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck,
Theodor-Heuss-Analge 12, 68165 Mannheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) Title: QUANTITATIVE DIAGNOSTIC ANALYSIS OF HYPERTONIA

(54) Bezeichnung: QUANTITATIVE DIAGNOSTISCHE ANALYSE DER HYPERTONIE

(57) **Abstract:** The invention relates to the use of the direct correlation between the overexpression or the functional molecular modification of human homologues of the sgk family and hypertonia for quantitatively diagnosing a specific form of genetically related hypertonia. The invention particularly relates to the detection of a direct relationship between two different polymorphisms of individual nucleotides in the hsgk1 gene and the genetically related predisposition to hypertonia. The invention additionally relates to the provision of a diagnostic kit containing antibodies or polynucleotides used for detecting diagnostic targets hsgk1, hsgk2 and hsgk3.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft die Verwendung der direkten Korrelation zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der sgk-Familie und der Hypertonie zur quantitativen Diagnose einer bestimmten Form der genetisch bedingten Hypertonie. Insbesondere betrifft die Erfindung den Nachweis eines unmittelbaren Zusammenhangs zwischen zwei unterschiedlichen Polymorphismen einzelner Nukleotide im hsgk1-Gen und der genetisch bedingten Prädisposition zur Hypertonie. Die Erfindung betrifft weiterhin die Bereitstellung eines Diagnosekits enthaltend Antikörper oder Polynukleotide zum Nachweis der diagnostischen Targets hsgk1, hsgk2 und hsgk3.

WO 02/074987 A2

5 **Quantitative diagnostische Analyse der Hypertonie**

10 Die vorliegende Erfindung betrifft die direkte Korrelation zwischen der Überexpression
oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der sgk-Familie
und der Hypertonie. Insbesondere betrifft die Erfindung den Nachweis eines unmittelbaren
Zusammenhangs zwischen zwei unterschiedlichen Polymorphismen einzelner Nukleotide
(single nucleotide polymorphisms = SNP) im hsgk1-Gen und der genetisch bedingten
15 Prädisposition zur Hypertonie.

Zahlreiche extrazelluläre Signale führen zu intrazellulären Phosphorylierungs-
/Dephosphorylierungskaskaden, um eine schnelle Übertragung dieser Signale von der
Plasmamembran und ihren Rezeptoren in das Zytoplasma und den Zellkern zu
20 gewährleisten. Die Spezifität dieser reversiblen Signaltransduktionskaskaden wird durch
eine Vielzahl von einzelnen Proteinen, insbesondere von Kinasen, die eine Phosphatgruppe
auf individuelle Substrate übertragen, ermöglicht.

Die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase (sgk), eine Serin/Threonin-Kinase,
25 deren Expression durch Serum und Glucocorticoide gesteigert wird, wurde zunächst aus
Rattenmammarkarzinomazellen kloniert (Webster et al., 1993). Die humane Version der
sgk, die hsgk1, wurde aus Leberzellen kloniert (Waldegger et al., 1997). Es zeigte sich, daß
die Expression der hsgk1 durch die Regulation des Zellvolumens beeinflusst wird. Für die
Expression der Ratten-sgk konnte eine solche Abhängigkeit vom Zellvolumen bisher nicht
30 nachgewiesen werden. Weiterhin ergab sich, daß die Ratten-Kinase den epithelialen Na⁺-
Kanal (ENaC) stimuliert (Chen et al., 1999; Naray-Pejes-Toth et al., 1999). Der ENaC
spielt wiederum eine entscheidende Rolle bei der renalen Na⁺-Ausscheidung. Eine

- 2 -

gesteigerte Aktivität des ENaC führt zu einer verstärkten renalen Retention von Natrium-Ionen, und auf diese Weise zur Entwicklung von Hypertonie.

Schließlich wurden zwei weitere Mitglieder der humanen sgk-Genfamilie kloniert, die hsgk2 und hsgk3 (Kobayashi et al., 1999), die beide - wie auch die hsgk1 - durch Insulin und IGF1 über den PI3 Kinase-Weg aktiviert werden. Elektrophysiologische Experimente zeigten, daß eine Coexpression der hsgk2 und hsgk3 ebenfalls eine signifikante Zunahme der Aktivität des ENaC zur Folge hat.

Aus der DE 197 08 173 A1 geht hervor, daß die hsgk1 bei vielen Krankheiten, bei denen Zellvolumenänderungen eine entscheidende pathophysiologische Rolle spielen, wie beispielsweise Hypernatriämie, Hyponatriämie, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, Hyperkatabolismus, hepatische Encephalopathie und mikrobielle oder virale Infektionen, ein beträchtliches diagnostisches Potential besitzt.

In der WO 00/62781 wurde bereits beschrieben, daß die hsgk1 den endothelialen Na^+ -Kanal aktiviert, wodurch die renale Na^+ -Resorption erhöht wird. Da diese gesteigerte renale Na^+ -Resorption mit Hypertonie einhergeht, wurde hier vermutet, daß eine gesteigerte Expression der hsgk1 zur Hypertonie, eine verminderte Expression der hsgk1 letztlich zur Hypotonie führen sollte.

Auch in der nicht-vorveröffentlichten, prioritätsälteren deutschen Anmeldung mit dem Titel "sgk2 und sgk3 als diagnostische und therapeutische Targets" (interne Bezeichnung A 35 048) vom 28.08.00 wurde ein ähnlicher Zusammenhang zwischen der Überexpression bzw. Überaktivität der humanen Homologen hsgk2 und hsgk3 mit der Überaktivierung des ENaCs, der daraus resultierenden verstärkten renalen Na^+ -Resorption und der sich daraus entwickelnden Hypertonie beschrieben. Weiterhin wurde bereits das diagnostische Potential der Kinasen hsgk2 und hsgk3 bezüglich der arteriellen Hypertonie diskutiert.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, einen experimentellen Nachweis zur direkten Korrelation, d.h. einer direkten Abhängigkeit zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der sgk-Familie und der Hypertonie aufzufinden.

- 3 -

Unter einem humanen Homologen der sgk-Familie, welches im obigen Sinne eine funktionale molekulare Modifikation umfaßt, versteht man in diesem Zusammenhang ein Homologes der sgk-Familie, das auf eine solche Art und Weise mutiert ist, daß die Eigenschaften, insbesondere die katalytischen Eigenschaften oder auch die Substratspezifität des entsprechenden Proteins verändert werden.

Weiterhin ist es Aufgabe der Erfindung diese direkte Korrelation bzw. Abhängigkeit zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der sgk-Familie und der Hypertonie in einem Verfahren zur Diagnose einer Prädisposition einer genetisch bedingten Form der Hypertonie einzusetzen.

Der Nachweis einer unmittelbaren Korrelation zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation der humanen sgk-Gene und der Hypertonie konnte im Rahmen der vorliegenden Erfindung erbracht werden und insbesondere am Beispiel des Gens hsgk1 experimentell bewiesen werden.

Eine Lösung der gestellten Aufgabe stellt daher die Verwendung dieser direkten Korrelation zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der sgk-Familie, insbesondere des hsgk1-Gens, und der Hypertonie zur Diagnose einer genetisch bedingten Form der Hypertonie dar.

Die gestellte Aufgabe wird insbesondere dadurch gelöst, daß im Rahmen der vorliegenden Erfindung zwei unterschiedliche SNPs im hsgk1-Gen identifiziert wurden, die - wenn sie in einer bestimmten Version im hsgk1-Gen vorliegen -, beim Patienten eine eindeutige Neigung zur Hypertonie hervorrufen. Die Existenz solcher SNPs im hsgk1-Gen oder auch in den übrigen humanen Homologen der sgk-Genfamilie kann somit als diagnostischer Hinweis auf eine genetisch bedingte Prädisposition zur Ausbildung einer Hypertonie in Körperproben des Patienten nachgewiesen werden.

Die gestellte Aufgabe wird weiterhin dadurch gelöst, daß ein diagnostisches Verfahren zur quantitativen Diagnose einer bestimmten Form der genetisch bedingten Hypertonie bereitgestellt wird, bei dem die Überexpression eines humanen Homologen der sgk-Familie oder die funktionale molekulare Modifikation dieser Homologen durch den quantitativen Nachweis der Homologen in der Körperprobe des Patienten mit Antikörpern, die gegen die Proteine der Homologen gerichtet sind, oder mit Polynukleotiden, die mit DNA oder mRNA der Homologen unter stringenten Bedingungen hybridisieren können,

- 4 -

detektiert wird, sowie durch einen diagnostischen Kit, der sich zur Durchführung dieses Verfahrens eignet.

Im erfindungsgemäßen Kit sind vorzugsweise solche Antikörper, die gegen das hsgk1-Protein gerichtet sind oder solche Polynukleotide, die mit dem hsgk1-Gen unter stringenten Bedingungen hybridisieren können, enthalten.

Bei diesem diagnostischen Kit werden insbesondere solche Antikörper bereitgestellt, die spezifisch gegen solche Regionen des hsgk1-Proteins gerichtet sind, welche ein entsprechend eines spezifischen SNP im hsgk1-Gen mutiertes hsgk1-Protein-Fragment umfassen. Der Kit kann jedoch auch Antikörper gegen die häufigeren Allele des hsgk1-Gens oder der übrigen humanen Homologen der sgk-Familie enthalten, mit denen ein modifiziertes Expressionsniveau dieser Homologen bzw. der hsgk1 quantitativ nachgewiesen werden kann.

Weiterhin sind im erfindungsgemäßen diagnostischen Kit vorzugsweise solche Polynukleotide enthalten, die spezifisch Regionen umfassend die eine oder andere Version eines Hypertonie-relevanten SNPs im hsgk1-Gen beinhalten und so zum Nachweis spezifischer SNPs im hsgk1-Gen des Patienten durch Hybridisierung unter stringenten Bedingungen mit genomischer DNA, cDNA oder mRNA aus Körperproben geeignet sind.

Die erfindungsgemäße direkte Korrelation zwischen der Hypertonie und den humanen Homologen der sgk-Familie impliziert, daß bei einzelnen Patienten individuelle Mutationen in den Genen hsgk1, hsgk2 oder hsgk3 auftreten könnten, die die Expressionshöhe oder die funktionellen Eigenschaften der Kinasen hsgk1, hsgk2 oder hsgk3 modifizieren, und so zu einer genetisch verursachten Neigung zur Hypertonie führen. Solche Mutationen könnten beispielsweise in den regulatorischen Genregionen oder auch in Intron-Sequenzen des sgk-Genlocus auftreten und damit eine Überexpression der entsprechenden Kinase und eine Überaktivierung des ENaC verursachen. Andererseits könnten individuelle Unterschiede in der genetischen Ausstattung des sgk-Locus auch den kodierenden Genbereich betreffen. Mutationen im kodierenden Bereich könnten dann gegebenenfalls zu einer funktionalen Veränderung der entsprechenden Kinase, so z.B. zu modifizierten katalytischen Eigenschaften der Kinase führen. Demnach könnten beide oben beschriebenen Mutationsarten eine verstärkte Aktivierung des ENaCs und damit letztlich die Ausbildung einer genetisch bedingten Form von Hypertonie beim Patienten bewirken.

Solche Mutationen in den humanen Homologen der sgk-Familie, die die Ausbildung einer genetisch bedingten Form von Hypertonie beim Patienten bewirken, sind in der Regel sogenannte "single nucleotide polymorphisms" (SNP) entweder im Exon- oder im Intron-Bereich dieser Homologen. SNPs im Exon-Bereich der hsgk-Gene können in ihrer weniger häufig auftretenden Version - im folgenden die mutierte Version genannt - gegebenenfalls zu Aminosäureaustauschen im entsprechenden hsgk-Protein und somit zur einer funktionalen Modifikation der Kinase führen. SNPs im Intron-Bereich oder in regulatorischen Sequenzen der hsgk-Gene können in ihrer mutierten Version gegebenenfalls zu einer veränderten Expressionshöhe der entsprechenden Kinase führen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde eine Korrelationsstudie durchgeführt, in der der Genotyp des hsgk1-Gens verschiedener Patienten (Zwillinge) mit den an ihnen gemessenen systolischen und diastolischen Blutdruckwerten, die jeweils in verschiedenen Körperpositionen gemessen wurden (sitzend, stehend, liegend), verglichen und statistisch ausgewertet wurde.

So konnte im Rahmen der vorliegenden Erfindung gezeigt werden, daß die Anwesenheit eines (C→T)-Austausches in Exon 8 (1. SNP, siehe SEQ ID NO. 1) auf beiden Allelen (homozygote TT-Träger des SNPs in Exon 8), der nicht zu einem Aminosäureaustausch auf Protein-Ebene führt (siehe SEQ ID NO. 2), zu signifikant höheren Blutdruckwerten und somit zu einer genetisch bedingten Neigung zur Hypertonie führt (Tab. 3).

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Gegenwart eines (T→C)-Austausches (2. SNP), welcher 551 bp entfernt vom 1. SNP in der Donor-Spleiß-Seite im Übergang von Intron 6 zu Exon 7 lokalisiert ist, in seiner homozygoten Ausführung zu geringeren Blutdruckwerten und somit zu einer geringeren genetisch bedingten Neigung zur Hypertonie führt (Tab. 3).

Da beide erfindungsgemäßen SNPs im hsgk1-Gen nicht zu Aminosäureaustauschen auf Protein-Ebene führen, wird die durch sie bedingte, stärker oder weniger stark ausgeprägte, genetische Prädisposition zur Hypertonie wahrscheinlich auf einer modifizierten Expressionshöhe des hsgk1-Gens basieren.

Der erste SNP in Exon 8 (C→T) wird weiterhin durch Figur 1 näher erläutert. In Figur 1 werden die einzelnen Exons des hsgk1-Gens dargestellt und jeweils durch die Exon.

- 6 -

Nummer, den Exon-ID, den dazugehörigen "Sequenz-Contig" und Strang, sowie Start, Ende und Länge der Exons beschrieben. Die exakte Position des (C→T)-Austausches im Rahmen des SNPs in Exon 8 wird durch das dunkel markierte C in Exon 8 angezeigt. Die hellere Markierung in Exon 8 in Figur 1 zeigt die SNP-flankierende Sequenz im hsgk1-Gen an, die die Position im Genom eindeutig bestimmt.

Der zweite SNP (T→C) in Intron 6 wurde durch direkte Sequenzierung identifiziert, und ist dadurch eindeutig charakterisiert, daß er im hsgk1-Gen (umfassend Exons und Introns) exakt 551 bp vom ersten SNP in Exon 8 stromaufwärts in der Donor-Spleißstelle des Introns 6 zu Exon 7 des hsgk1-Gens lokalisiert ist und den Austausch eines T in ein C betrifft.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die in verschiedenen Körperpositionen gemessenen systolischen und diastolischen Blutdruckwerte alle in dem gleichen Ausmaß eine Abhängigkeit vom Genotyp des hsgk1-Gens zeigen (Tab. 4). Aus Tabelle 4 ist somit ersichtlich, daß die gefundenen Korrelationen zwischen dem gemessenen Blutdruck der Patienten und dem Auftreten der oben genannten Polymorphismen (SNPs) in ihren hsgk1-Genen tatsächlich statistisch relevant sind.

Weiterhin zeigen die beiden analysierten SNPs im hsgk1-Gen eine große Unausgeglichenheit in der Häufigkeit ihres korrelierten Auftretens (Tab. 5). Während die meisten CC-Träger des SNPs in Exon 8 auch TT-Träger des SNPs in Intron 6 sind (64%), ist dies umgekehrt nicht der Fall (nur 2% der Exon 8 TT-Träger sind auch Intron 6 CC-Träger).

Die erstmalig nachgewiesene Korrelation zwischen dem Blutdruck des Patienten und seiner individuellen genetischen Version des hsgk1-Genlocus zeigt, daß sich spezifische Antikörper oder Polynukleotide, die gegen hsgk1 gerichtet sind, zur Diagnose einer speziellen genetisch bedingten Neigung zur Hypertonie eignen. Diese spezielle genetisch verursachte Form der Hypertonie kann durch eine gesteigerte Expression der hsgk1, also durch Überexpression oder gegebenenfalls auch durch modifizierte funktionale Eigenschaften der hsgk1 charakterisiert sein.

- 7 -

Da die beiden homologen Kinasen der sgk-Familie, hsgk2 und hsgk3, ebenfalls den ENaC aktivieren, eignen sich erfindungsgemäß spezifische Antikörper und Polynukleotide, die gegen hsgk2 oder hsgk3 gerichtet sind, im gleichen Maß zur diagnostischen Analyse spezieller genetisch bedingter Formen der Hypertonie.

5

Der erfindungsgemäße Nachweis, daß das Auftreten der beiden SNPs im hsgk1-Gen mit einer Neigung zur Hypertonie korreliert, zeigt, daß insbesondere Polynukleotide, die eine oder andere Version der beiden SNPs im hsgk1-Gen umfassen, sich in besonderem Maß zur Diagnose einer genetisch bedingten Form der Hypertonie durch Hybridisierung mit endogener DNA (cDNA oder genomische DNA) oder mRNA aus einer Körperprobe des Patienten eignen.

10

Ähnlich eignen sich nach den vorliegenden Ergebnissen auch Antikörper zur Diagnose einer genetisch bedingten Prädisposition der Hypertonie, die gegen spezifische Hypertonie-relevante Polymorphismen (SNP) im hsgk1-Protein oder einem seiner humanen Homologen gerichtet sind. Solche SNPs, die auch auf Protein-Ebene zu einem Hypertonie-relevanten Polymorphismus führen, könnten insbesondere mit einer funktionalen Modifikation des hsgk1-Proteins einhergehen und so eine Prädisposition zur Hypertonie verursachen.

15

20

Die vorliegende Erfindung betrifft somit die Verwendung der direkten Korrelation, d.h. einer direkten Abhängigkeit zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der sgk-Familie, insbesondere der hsgk1, und der Hypertonie zur quantitativen Diagnose einer bestimmten Form der genetisch bedingten Hypertonie.

25

Hierbei werden insbesondere die beiden mit der Neigung zur Hypertonie korrelierenden SNPs im hsgk1-Gen zur quantitativen Diagnose einer genetisch bedingten Hypertonie eingesetzt.

30

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur quantitativen Diagnose einer genetisch bedingten Form der Hypertonie, bei dem die Überexpression eines humanen Homologen der sgk-Familie oder die funktionale molekulare Modifikation dieser Homologen durch den quantitativen Nachweis der Homologen in der Körperprobe des Patienten mit Antikörpern, die gegen die Proteine der Homologen gerichtet sind, oder mit

35

Polynukleotiden, die mit genomischer DNA, c-DNA oder mRNA der Homologen unter stringenten Bedingungen hybridisieren können, detektiert wird.

Bei diesem erfindungsgemäßen Diagnose-Verfahren werden als Körperproben des Patienten vorzugsweise Blutproben oder auch Speichelproben verwendet, die zelluläres Material umfassen und relativ wenig aufwendig vom Patienten gewonnen werden können. Andere Körperproben, die ebenfalls Zellen umfassen wie beispielsweise Gewebeproben u.ä., können jedoch auch verwendet werden. Aus diesem zellhaltigen Material der Körperproben kann dann entweder genomische DNA oder cDNA oder auch mRNA nach Standardmethoden (Sambrook-J and Russell-DW (2001) Cold Spring Harbor, NY, CSHL Press).

präpariert und gegebenenfalls amplifiziert werden und anschließend mit Polynukleotiden, die mit dieser genomischen DNA, cDNA oder auch mRNA spezifisch hybridisieren kann, unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Weiterhin kann aus dem zellhaltigen Material der Körperproben (Blut, Speichel, Gewebe usw) auch ein Protein-Extrakt nach Standardmethoden (Sambrook-J and Russell-DW (2001) Cold Spring Harbor, NY, CSHL Press) isoliert werden, in dem dann das entsprechende sgk-Protein durch Inkubation mit einem Antikörper, der gegen dieses Protein gerichtet ist, quantitativ detektiert werden kann.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden vorzugsweise Antikörper gegen das hsgk1-Protein oder Polynukleotide, die mit genomischer DNA, c-DNA oder mRNA des hsgk1-Gens hybridisieren können, eingesetzt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden insbesondere Polynukleotide eingesetzt, welche mit DNA, c-DNA oder mRNA einer Version des SNP in Intron 6 des hsgk1-Gens oder einer Version des SNP in Exon 8 des hsgk1-Gens unter stringenten Bedingungen hybridisieren können.

Unter einer Hybridisierung unter stringenten Bedingungen wird in diesem Zusammenhang eine Hybridisierung unter solchen Hybridisierungsbedingungen bezüglich Hybridisierungstemperatur und Formamid-Gehalt der Hybridisierungslösung verstanden, wie sie in einschlägiger Fachliteratur (Sambrook-J and Russell-DW (2001) Cold Spring Harbor, NY, CSHL Press) beschrieben wurde.

- 9 -

Die Erfindung betrifft außerdem einen Kit zur quantitativen Diagnose einer bestimmten Form der genetisch bedingten Form der Hypertonie, enthaltend Antikörper, die gegen die humanen Homologen der sgk-Protein-Familie gerichtet sind, oder Polynukleotide, die mit den humanen Homologen der sgk-Gen-Familie unter stringenten Bedingungen hybridisieren können, oder diese Antikörper und Polynukleotide gemeinsam zur quantitativen Bestimmung der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation dieser Homologen.

Die im Kit enthaltenen Antikörper sind hierbei vorzugsweise gegen das hsgk1-Protein gerichtet, und die im Kit enthaltenen Polynukleotide können hierbei vorzugsweise mit dem hsgk1-Gen hybridisieren.

Der diagnostische Kit kann besonders bevorzugt Polynukleotide enthalten, die mit genomischer DNA, mit cDNA oder mit mRNA einer Version des SNP in Intron 6 (T→C) oder des SNP in Exon 8 (C→T) hybridisieren können.

Durch die nachfolgenden Beispiele wird die vorliegende Erfindung im Detail erläutert.

Beispiel 1

Es wurden 75 zweieigige Zwillingspärchen zur Korrelationsanalyse herangezogen (Busjahn et al., J Hypertens 1996, 14: 1195-1199; Busjahn et al., Hypertension 1997, 29: 165-170). Die Versuchspersonen waren alle Angehörige der deutsch-kaukasischen Rasse und stammten aus verschiedenen Teilen Deutschlands. Zur Verifikation der Zweieigigkeit und für weitere molekulargenetische Analysen wurde den Zwillingspärchen, sowie deren Eltern Blut entnommen. Jede teilnehmende Versuchsperson wurde zuvor ärztlich untersucht. Für keine der Versuchspersonen war eine chronisch-medizinische Erkrankung bekannt. Nach 5 min wurde der Blutdruck des Probanden in sitzender Position von einem ausgebildeten Arzt mit einem standardisierten Quecksilber-Sphygmomanometer gemessen (2 Messungen mit einem zeitlichen Intervall von 1 min). Der Mittelwert aus den beiden Messungen wurde als Blutdruckwert verwendet.

Der Vorteil von zweieigigen Zwillingen für Korrelationsstudien liegt darin, daß sie im Alter übereinstimmen und daß die äußeren Einflüsse auf ihre Phenotypen als minimal einzuschätzen sind (Martin et al., Nat Genet 1997, 17: 387-392).

Die Bedeutung von Zwillingsstudien bei der Aufklärung komplexer genetischer Krankheiten wurde kürzlich von Martin et al., 1997 beschrieben.

Die Zweieigigkeit der Zwillingspärchen wurde durch die Amplifikation von fünf Mikrosatelliten-Markern mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) bestätigt. Bei dieser Analyse von Mikrosatelliten-Markern werden Desoxyribonucleinsäure (DNA) - Fragmente mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide durch PCR amplifiziert, die bei verschiedenen menschlichen Individuen hochvariable Regionen beinhalten. Die hohe Variabilität in diesen Regionen des Genoms kann durch geringfügige Größenunterschiede der amplifizierten Fragmente detektiert werden, wodurch sich bei einer Diversität am entsprechenden Genort Doppelbanden, sogenannte Mikrosatelliten-Banden, nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte bilden (Becker et al., J Reproductive Med 1997, 42: 260-266).

Für die molekulargenetische Analyse des Zielgens, hier des hsgk1-Gens, wurden drei weitere Mikrosatelliten-Marker Regionen (d6s472, d6s1038, d6s270) in unmittelbarer Nähe des hsgk1-Locus durch PCR amplifiziert und anschließend mit den entsprechenden Proben des anderen Zwillings und der Eltern verglichen. Auf diese Weise konnte entschieden werden, ob die Zwillinge von ihren Eltern identische oder unterschiedliche Allele bezüglich des untersuchten Allels geerbt hatten. Die Korrelationsanalyse wurde mit Hilfe des sogenannten "structural equation modeling" (SEM) Modells durchgeführt (Eaves et al., Behav Genet 1996, 26: 519-525; Neale, 1997: Mx: Statistical modeling. Box 126 MCV, Richmond, VA 23298: Department of Psychiatry. 4th edition). Dieses Modell basiert auf Varianz-Kovarianz Matrizen der Test-Paare, die durch die Wahrscheinlichkeit, daß sie entweder keines, eines oder zwei identische Allele besitzen, charakterisiert sind. Die Varianz bezüglich des Phänotyps wurde aufgeteilt in eine Varianz, die auf dem genetischen Hintergrund aller Gene (A), eine Varianz, die auf dem genetischen Hintergrund des Zielgens (Q), hier des hsgk1-Gens, und der Varianz aufgrund äußerer Einflüsse (E) beruht.

$$\text{VAR} = A^2 + Q^2 + E^2$$

- 11 -

Für die drei möglichen Allelkombinationen IBD_0 , IBD_1 , IBD_2 (IBD = "identical by descent"; 0, 1 oder 2 identische Allele) wurde die Kovarianz eines Test-Paares wie folgt definiert:

$$5 \quad COV(IBD_0) = 0,5 A^2 \quad COV(IBD_1) = 0,5 A^2 + 0,5 Q^2 \quad COV(IBD_2) = 0,5 A^2 + Q^2$$

Um die Korrelation zwischen der genetischen Ausstattung des hsgk1-Locus und dem Blutdruck des Probanden abzuschätzen, wurden die Differenzen zwischen Modellen, die die genetische Varianz bezüglich des Zielgens hsgk1 berücksichtigen bzw. nicht
10 berücksichtigen, als χ^2 -Statistik berechnet. Für jedes Paar und jeden Genlocus wurden die Allelenverhältnisse durch das sogenannte "multipoint" Modell (MAPMAKER/SIBS; Kruglyak et al., Am J Hum Genet 1995, 57: 439-454) basierend auf den elterlichen Genotypen errechnet.

15 Die höhere Aussagekraft der Analysemethode, die auf einer Varianz-Kovarianz Abschätzung beruht, im Vergleich zur oben beschriebenen χ^2 -Statistik (S.A.G.E. Statistical Analysis for Genetic Epidemiology, Release 2.2. Computer program package, Department of Epidemiology and Biostatistics, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA, 1996) wurde kürzlich in einer Simulationsstudie bestätigt (Fulker et al., Behav Gen
20 1996, 26: 527-532). Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$ akzeptiert, um eine signifikante Korrelation bezüglich der Kriterien von Lander und Kruglyak zu gewährleisten (Lander et al., Nat Genet 1995, 11: 241-246).

Die Ergebnisse dieser Korrelationsstudie zeigt Tabelle 1.

25

Tabelle 1:

Phenotyp	max χ^2	p
systolischer Blutdruckwert (liegend)	4,44	0,04
diastolischer Blutdruckwert (liegend)	14,36	0,0002
systolischer Blutdruckwert (sitzend)	5,55	0,019
diastolischer Blutdruckwert (sitzend)	4,92	0,027
systolischer Blutdruckwert (stehend)	1,91	0,17
diastolischer Blutdruckwert (stehend)	4,83	0,028

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich, beweisen die niedrigen Werte für die ermittelten Irrtumswahrscheinlichkeiten p , die die akzeptierte Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ nicht oder nur geringfügig überschreiten, die direkte Korrelation zwischen der genetischen Varianz bezüglich des hsgk1-Genorts und der phenotypisch ermittelten Varianz des gemessenen Blutdrucks.

Beispiel 2

Die genomische Organisation des hsgk 1-Gens wurde bereits beschrieben (Waldegger et al, Genomics, 51, 299 [1998]),
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000118515).

Zur Identifizierung von SNPs, deren Auftreten für eine Prädisposition zur Ausbildung einer Hypertonie relevant sind, wurden zunächst die in Datenbanken publizierten SNPs im hsgk1-Gen danach untersucht, ob es sich um echte SNPs - und nicht um reine Sequenzierfehler - handelt und ob die SNPs ausreichend polymorph sind, um die Basis für einen diagnostischen Nachweis einer Prädisposition zur Hypertonie zu stellen. Der SNP rs 1057293 in Exon 8, der einen Austausch eines C in ein T betrifft, erfüllte die geforderten Voraussetzungen (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/snpview?snp=1057293; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=1057293). Weiterhin wurde ein zweiter SNP durch direkte Sequenzierung identifiziert, der im hsgk1-Gen exakt 551 bp vom ersten SNP entfernt in der Donor-Spleißstelle des Introns 6 zu Exon 7 lokalisiert ist und den Austausch eines T in ein C betrifft. Diese beiden SNPs in Intron 6 (T→C) und in Exon 8 (C→T) wurden wie im folgenden beschrieben analysiert.

Nach der PCR-Amplifikation wurde jeweils 1 Unit Alkaline Phosphatase und 1 Unit Exonuklease I hinzugefügt, um die PCR-Primer zu degenerieren und die dNTPs zu dephosphorylieren. Die PCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: 95° C für 10 min, dann 35 Zyklen bei 95° für 15 sec, gefolgt von 62°C for 15 sec, gefolgt von 72°C für 30 sec, und einem Extensionsschritt bei 72° C für 10 min in einem 9600 Thermocycler (Applied Biosystems).

- 13 -

Die Mini-Sequenzierungsreaktionen wurden mit den Primern für den Intron 6 SNP (T→C) 5'-CTC CTT GCA GAG TCC GAA und für den Exon 8 SNP (C→T) 5'-ACC AAG TCA TTC TGG GTT GC durchgeführt. 0,15 pmol aufgereinigtes PCR-Produkt wurde bei der Sequenzierungs-PCR als Template eingesetzt. Für die Sequenzierungs-PCR wurden 25
5 Amplifikationszyklen durchgeführt mit den folgenden Einzelschritten: Denaturierung 10 s bei 96 °C, Annealingschritt 10 s bei 50 °C und Extensionsschritt 30 s bei 60 °C in einem 9600 Thermocycler.

Bei denselben Patienten, deren SNP-Genotyp des hsgk1-Gens bestimmt wurde, wurden die
10 systolischen und diastolischen Blutdruckwerte in liegender, stehender und sitzender Position gemessen, um eine eventuelle Korrelation zwischen SNP-Genotyp des hsgk1-Gens und dem Blutdruck zu ermitteln.

Tabelle 2 zeigt einige demographische Zwillingsdaten und die Resultate der
15 Korrelationsanalyse zwischen der genetischen Ausstattung des hsgk1-Genlocus und dem gemessenen Blutdruck. Ein starker genetischer Einfluß auf den gemessenen Blutdruck in allen Positionen konnte bei den Versuchspersonen nachgewiesen werden.

20

25

30

35

Tabelle 2:

Phänotyp	eineiige Zwillinge	zweieiige Zwillinge	a^2 ($r_{\text{eineiig}}/r_{\text{zweieiig}}$)	p (Korrelation)
N	200	132		
Alter y	29±12	31±12		
Geschlecht (M/F)	52/148	85/47		
Größe (cm)	169±8	170±8		
Gewicht (kg)	65±11	67±12		
body mass index (BMI) Gewicht/ Größe ² (kg/m ²)	22.4±3.5	22.8±3.4		
Systolischer Blutdruck (liegend) (mm Hg)	128±17	124±14	0.69 (0.69/0.31)	0.04
Diastolischer Blutdruck (liegend) (mm Hg)	71±12	71±11	0.66 (0.66/0.42)	0.0002
Systolischer Blutdruck (sitzend) (mm Hg)	125±16	123±13	0.74 (0.74/0.38)	0.019
Diastolischer Blutdruck (sitzend) (mm Hg)	73±11	73±10	0.72 (0.72/0.51)	0.027
Systolischer Blutdruck (stehend) (mm Hg)	124±15	122±14	0.67 (0.66/0.48)	0.04
Diastolischer Blutdruck (stehend) (mm Hg)	80±10	79±10	0.64 (0.63/0.40)	0.0002

- 5 Tabelle 3 zeigt weitere Resultate der erfindungsgemäßen Korrelationsstudien. Die ermittelten Allelhäufigkeiten für den SNP in Exon 8 liegen bei C 91% und T 9% und für den SNP in Intron 6 bei T 79% und C 21% (das Hardy-Weinberg Gleichgewicht wurde für beide Polymorphismen erhalten).
- 10 Die gemessenen Blutdruckwerte zeigten in allen Positionen (sitzend, liegend, stehend) die gleichen Trends. Homozygote CC-Träger und heterozygote CT-Träger des SNPs in Exon 8 zeigten keine voneinander abweichende Blutdruckwerte, zeigten jedoch deutlich niedrigere

systolische und diastolische Blutdruckwerte als homozygote TT-Träger des SNPs in Exon 8.

Die entsprechenden Resultate der Korrelationsstudien sind für den SNP in Intron 6 im Vergleich zum SNP in Exon 8 weniger konsistent. Es zeigte sich jedoch, daß homozygote CC-Träger des SNPs in Intron 6 generell niedrigere Blutdruckwerte aufweisen als homozygote TT-Träger und als heterozygote TC-Träger des SNPs in Intron 6.

10 **Tabelle 3:**

Phänotyp	1. SNP in Exon 8 CC	1. SNP in Exon 8 CT	1. SNP in Exon 8 TT	1. SNP in Exon 8 CC/CT	2. SNP in Intron 6 TT	2. SNP in Intron 6 CT	2. SNP in Intron 6 CC	2. SNP in Intron 6 TT/CT
systol. Blut- druck (liegend)	125 ± 15	125 ± 18	132 ± 14	125 ± 16	125 ± 16	128 ± 18	119 ± 6	126 ± 16
diastol. Blut- druck (liegend)	70 ± 10	72 ± 13	74 ± 12	71 ± 11	71 ± 10	72 ± 13	67 ± 10	71 ± 11
systol. Blut- druck (sitzend)	124 ± 14	123 ± 15	129 ± 13	124 ± 14	124 ± 14	125 ± 17	117 ± 6	124 ± 14
diastol. Blut- druck (sitzend)	72 ± 10	74 ± 10	79 ± 9	73 ± 10	73 ± 10	74 ± 11	72 ± 9	73 ± 10
systol. Blutdruck (stehend)	123 ± 15	123 ± 14	129 ± 13	123 ± 15	123 ± 14	126 ± 16	119 ± 8	123 ± 15
diastol. Blutdruck (stehend)	79 ± 10	81 ± 10	84 ± 8	80 ± 10	80 ± 10	82 ± 11	78 ± 8	80 ± 10

Tabelle 4 zeigt im Detail, daß sowohl für den systolischen als auch für den diastolischen Blutdruckwert die genetische Ausstattung des SNPs in Intron 6 weitgehend gleichermaßen signifikant ist, und zwar unabhängig von der Position, in der der Blutdruck gemessen wurde (sitzend, stehend, liegend). Die Resultate für die Signifikanz der genetischen Ausstattung des SNPs in Exon 8 sind ähnlich, die Assoziation der Signifikanz zwischen

den gemessenen systolischen und diastolischen Blutdruckwerten in den verschiedenen Positionen ist jedoch etwas weniger ausgeprägt als bei dem SNP in Intron 6.

5

Tabelle 4:

Phänotyp	2. SNP in Intron 6	1. SNP in Exon 8
Systolischer Blutdruck (liegend)	<0.01	<0.05
Diastolischer Blutdruck (liegend)	<0.05	0.08
Systolischer Blutdruck (sitzend)	<0.05	<0.05
Diastolischer Blutdruck (sitzend)	<0.01	0.08
Systolischer Blutdruck (stehend)	<0.05	0.07
Diastolischer Blutdruck (stehend)	<0.05	0.09

10

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, besteht ein starkes Korrelationsungleichgewicht zwischen den beiden analysierten SNPs: während die meisten CC-Träger des SNPs in Exon 8 auch TT-Träger des SNPs in Intron 6 sind (64%), ist dies umgekehrt nicht der Fall (nur 2% der Exon 8 TT-Träger sind auch Intron 6 CC-Träger).

15

Tabelle 5:

	Intron 6 TT	Intron 6 TC	Intron 6 CC
Exon 8 CC	197 (64%)	59 (19%)	3 (1%)
Exon 8 CT	2 (1%)	30 (10%)	11 (4%)
Exon 8 TT	0 (0%)	0 (0%)	6 (2%)

Patentansprüche

- 5 1. Verwendung der direkten Korrelation zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der sgk-Familie und der Hypertonie zur quantitativen Diagnose einer bestimmten Form der genetisch bedingten Hypertonie.
- 10 2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das humane Homologe der sgk-Familie das hsgk1-Gen ist.
3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Überexpression oder die funktionale Modifikation durch den Nukleotidpolymorphismus (SNP) in
15 Intron 6 (T→C) im hsgk1-Gen verursacht wird.
4. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Überexpression oder die funktionale Modifikation durch den Nukleotidpolymorphismus (SNP) in
20 Exon 8 (C→T) im hsgk1-Gen verursacht wird.
5. Kit zur quantitativen Diagnose einer bestimmten Form der genetisch bedingten Form der Hypertonie, enthaltend Antikörper, die gegen die humanen Homologen der sgk-Protein-Familie gerichtet sind, oder Polynukleotide, die mit den humanen Homologen der sgk-Gen-Familie unter stringenten Bedingungen hybridisieren
25 können, oder diese Antikörper und Polynukleotide gemeinsam zur quantitativen Bestimmung der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation dieser Homologen.
6. Kit nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das humane Homologe der sgk-Familie das hsgk1-Gen ist.
30
7. Kit nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper gegen eine durch einen SNP mutierte Version des hsgk1-Proteins gerichtet sind oder daß die Polynukleotide mit einer durch einen SNP mutierten Version des hsgk1-Gens unter
35 stringenten Bedingungen hybridisieren können.

- 18 -

8. Kit nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Polynukleotide mit einer durch den SNP in Intron 6 (T→C) mutierten Version des hsgk1-Gens unter stringenten Bedingungen hybridisieren können.
- 5 9. Kit nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Polynukleotide mit einer durch den SNP in Exon 8 (C→T) mutierten Version des hsgk1-Gens unter stringenten Bedingungen hybridisieren können.
- 10 10. Verfahren zur quantitativen Diagnose einer bestimmten Form der genetisch bedingten Form der Hypertonie, bei dem die Überexpression eines humanen Homologen der sgk-Familie oder die funktionale molekulare Modifikation dieser Homologen durch den quantitativen Nachweis der Homologen in der Körperprobe des Patienten mit Antikörpern, die gegen die Proteine der Homologen gerichtet sind, oder mit Polynukleotiden, die mit DNA oder mRNA der Homologen unter
15 stringenten Bedingungen hybridisieren können, detektiert wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das humane Homologe der sgk-Familie das hsgk1-Gen ist.
- 20 12. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Polynukleotide mit DNA oder mRNA einer Version des SNP in Intron 6 (T→C) im hsgk1-Gen unter stringenten Bedingungen hybridisieren können.
- 25 13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Polynukleotide mit DNA oder mRNA einer Version des SNP in Exon 8 (C→T) im hsgk1-Gen unter stringenten Bedingungen hybridisieren können.

Figure1:

1	ENSE00000798789	AL135839.15.1.113673	-1	27517	27634	118 bp
GGTCTTTGAGCGCTAACGTCTTTCTGTCTCCCCGCGGTGGTGATGACGGT						
GAAAACTGAGGCTGCTAAGGGCACCTCACTTACTCCAGGATGAGGGGCA						
TGGTGGCAATTCTCATCG						
2	ENSE00000798790	AL135839.15.1.113673	-1	27296	27371	76 bp
CTTTCATGAAGCAGAGGAGGATGGGTCTGAACGACTTTATTGAGAAGATT						
GCCAATAACTCCTATGCATGCAAACA						
3	ENSE00000798791	AL135839.15.1.113673	-1	26790	26865	76 bp
CCCTGAAGTTCAGTCCATCTTGAAGATCTCCCAACCTCAGGAGCCTGAGC						
TTATGAATGCCAACCCCTTCTCCTCCA						
4	ENSE00000798792	AL135839.15.1.113673	-1	26247	26351	105 bp
CCAAGTCCTTCTCAGCAAATCAACCTTGGCCCCGTCTCAATCCTCATGC						
TAAACCATCTGACTTTCACCTTCTTGAAAGTGATCGGAAAGGGCAGTTTTG						
GAAAG						
5	ENSE00000798793	AL135839.15.1.113673	-1	26059	26142	84 bp
GTTCTTCTAGCAAGACACAAGGCAGAAGAAGTGTTCTATGCAGTCAAAGT						
TTTACAGAAGAAAGCAATCCTGAAAAAGAAAGAG						
6	ENSE00000798794	AL135839.15.1.113673	-1	25808	25939	132 bp
GAGAAGCATATTATGTCTGGAGCGGAATGTTCTGTTGAAGAATGTGAAGCA						
CCCTTTCCTGGTGGGCCTTCACTTCTCTTCCAGACTGCTGACAAATTGT						
ACTTTGTCTTAGACTACATTAATGGTGGAGAG						
7	ENSE00000798795	AL135839.15.1.113673	-1	25447	25559	113 bp
TTGTTCTACCATCTCCAGAGGGAACGCTGCTTCTGGAACACGGGCTCG						
TTTCTATGCTGCTGAAATAGCCAGTGCCTTGGGCTACCTGCATTCACTGA						
ACATCGTTTATAG						
8	ENSE00000798796	AL135839.15.1.113673	-1	24978	25101	124 bp
AGACTTAAACCAGAGAATATTTTGCTAGATTCAAGGGACACATTGTCCTT						
<u>ACTGA</u> <u>TTCCGACTCTGCAAGGAGAACATTGAACACAACAGCACAACA</u>						
TCCACCTTCTGTGGCAGCCGGAG						
9	ENSE00000798797	AL135839.15.1.113673	-1	24422	24517	96 bp
TATCTCGCACCTGAGGTGCTTCATAAGCAGCCTTATGACAGGACTGTGGA						
CTGGTGGTGCCTGGGAGCTGTCTTGATGAGATGCTGTATGGCCTG						
10	ENSE00000798798	AL135839.15.1.113673	-1	23808	23963	156 bp
CCGCCTTTTATAGCCGAAACACAGCTGAAATGTACGACAACATTCTGAA						
CAAGCCTCTCCAGCTGAAACCAAATATTACAAATTCGCAAGACACCTCC						
TGGAGGGCCTCCTGCAGAAGGACAGGACAAAGCGGCTCGGGGCCAAGGAT						
GACTTC						
11	ENSE00000798799	AL135839.15.1.113673	-1	23611	23700	90 bp
ATGGAGATTAAGAGTCATGTCTTCTCCTTAATTAACCTGGGATGATCT						
CATTAATAAGAAGATTACTCCCCCTTTTAACCCAAATGTG						
12	ENSE00000798800	AL135839.15.1.113673	-1	22037	23220	1184 bp
AGTGGGCCCCAACGACCTACGGCACTTTGACCCCGAGTTTACCGAAGAGCC						
TGTCCCCAACTCCATTGGCAAGTCCCCTGACAGCGTCTCGTCACAGCCA						
GCGTCAAGGAAGCTGCCGAGGCTTTCCTAGGCTTTTCCTATGCGCCTCCC						
ACGGACTCTTTCCTCTGAACCCTGTTAGGGCTTGGTTTTAAAGGATTTTA						
TGTGTGTTTCCGAATGTTTTAGTTAGCCTTTTGGTGGAGCCGCCAGCTGA						
CAGGACATCTTACAAGAGAATTTGCACATCTCTGGAAGCTTAGCAATCTT						
ATTGCACACTGTTTCGCTGGAAGCTTTTGAAGAGCACATTCTCCTCAGTG						
AGCTCATGAGGTTTTTCATTTTTATTCTTCTTCCAACGTGGTGCTATCTC						
TGAAACGAGCGTTAGAGTGCCGCCTTAGACGGAGGCAGGAGTTTCGTTAG						
AAAGCGGACGCTGTTCTAAAAAAGGTCTCCTGCAGATCTGTCTGGGCTGT						
GATGACGAATATTATGAAATGTGCCTTTTCTGAAGAGATTGTGTTAGCTC						
CAAAGCTTTTCTATCGCAGTGTTTCAGTTCTTTATTTTCCCTTGTGGAT						
ATGCTGTGTGAACCGTCGTGTGAGTGTGGTATGCCTGATCACAGATGGAT						
TTTGTTATAAGCATCAATGTGACACTTGCAGGACACTACAACGTGGGACA						
TTGTTTGTTCCTTCCATATTTGGAAGATAAA'TTATGTGTAGACTTTTTT						
GTAAGATACGGTTAATAACTAAAATTTATTGAAATGGTCTTGCAATGACT						
CGTATTCAGATGCTTAAAGAAAGCATTGCTGCTACAAATATTTCTATTTT						
TAGAAAGGGTTTTTATGGACCAATGCCCCAGTTGTCAGTCAGAGCCGTTG						
GTGTTTTTTCATTGTTTAAATGTACCTGTAAAATGGGCATTATTTATGT						
TTTTTTTTTTTGCATTCTGATAATTGTATGTATTGTATAAAGAACGTCTG						
TACATTGGGTTATAACACTAGTATATTTAAACTTACAGGCTTATTTGTAA						
TGTAACCAACCATTTTAATGTACTGTAATTAACATGGTTATAATACGTAC						
AATCCTTCCCTCATCCCATCACACAACCTTTTTTTTGTGTGTGATAAACTGA						
TTTTGGTTTGCAATAAAACCTTGAAAAATATTTA						

L61882PC.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Lang, Florian

<120> Quantitative diagnostische Analyse der Hypertonie

<130> L61882

<140> DE 101 13 876.8

<141> 2001-03-21

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2354

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (43)..(1335)

<223>

<220>

<221> variation

<222> (762)..(762)

<223> 1. SNP (C in T), stumme Mutation, d.h. beide Versionen des SNPs resultieren in der Aminosäure Asp in der Aminosäure- Position 240

<400> 1

gggtctttgag cgctaacgtc tttctgtctc cccgcggtgg tg atg acg gtg aaa 54
Met Thr Val Lys
1

act gag gct gct aag ggc acc ctc act tac tcc agg atg agg ggc atg 102
Thr Glu Ala Ala Lys Gly Thr Leu Thr Tyr Ser Arg Met Arg Gly Met
5 10 15 20

gtg gca att ctc atc gct ttc atg aag cag agg agg atg ggt ctg aac 150
Val Ala Ile Leu Ile Ala Phe Met Lys Gln Arg Arg Met Gly Leu Asn
25 30 35

gac ttt att cag aag att gcc aat aac tcc tat gca tgc aaa cac cct 198
Asp Phe Ile Gln Lys Ile Ala Asn Asn Ser Tyr Ala Cys Lys His Pro
40 45 50

gaa gtt cag tcc atc ttg aag atc tcc caa cct cag gag cct gag ctt 246
Glu Val Gln Ser Ile Leu Lys Ile Ser Gln Pro Gln Glu Pro Glu Leu
55 60 65

atg aat gcc aac cct tct cct cca cca agt cct tct cag caa atc aac 294
Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Pro Ser Pro Ser Gln Gln Ile Asn
70 75 80

L61882PC.ST25

ctt Leu 85	ggc Gly	ccg Pro	tcg Ser	tcc Ser	aat Asn 90	cct Pro	cat His	gct Ala	aaa Lys	cca Pro 95	tct Ser	gac Asp	ttt Phe	cac His	ttc Phe 100	342
ttg Leu	aaa Lys	gtg Val	atc Ile	gga Gly 105	aag Lys	ggc Gly	agt Ser	ttt Phe	gga Gly 110	aag Lys	gtt Val	ctt Leu	cta Leu	gca Ala 115	aga Arg	390
cac His	aag Lys	gca Ala	gaa Glu 120	gaa Glu	gtg Val	ttc Phe	tat Tyr	gca Ala 125	gtc Val	aaa Lys	gtt Val	tta Leu	cag Gln 130	aag Lys	aaa Lys	438
gca Ala	atc Ile	ctg Leu 135	aaa Lys	aag Lys	aaa Lys	gag Glu	gag Glu 140	aag Lys	cat His	att Ile	atg Met	tcg Ser 145	gag Glu	cgg Arg	aat Asn	486
gtt Val 150	ctg Leu	ttg Leu	aag Lys	aat Asn	gtg Val	aag Lys 155	cac His	cct Pro	ttc Phe	ctg Leu	gtg Val 160	ggc Gly	ctt Leu	cac His	ttc Phe	534
tct Ser 165	ttc Phe	cag Gln	act Thr	gct Ala	gac Asp 170	aaa Lys	ttg Leu	tac Tyr	ttt Phe	gtc Val 175	cta Leu	gac Asp	tac Tyr	att Ile	aat Asn 180	582
ggc Gly	gga Gly	gag Glu	ttg Leu	ttc Phe 185	tac Tyr	cat His	ctc Leu	cag Gln	agg Arg 190	gaa Glu	cgc Arg	tgc Cys	ttc Phe	ctg Leu 195	gaa Glu	630
cca Pro	cgg Arg	gct Ala	cgt Arg 200	ttc Phe	tat Tyr	gct Ala	gct Ala	gaa Glu 205	ata Ile	gcc Ala	agt Ser	gcc Ala	ttg Leu 210	ggc Gly	tac Tyr	678
ctg Leu	cat His	tca Ser 215	ctg Leu	aac Asn	atc Ile	gtt Val	tat Tyr 220	aga Arg	gac Asp	tta Leu	aaa Lys	cca Pro 225	gag Glu	aat Asn	att Ile	726
ttg Leu 230	cta Leu	gat Asp	tca Ser	cag Gln	gga Gly	cac His 235	att Ile	gtc Val	ctt Leu	act Thr	gac Asp 240	ttc Phe	gga Gly	ctc Leu	tgc Cys	774
aag Lys 245	gag Glu	aac Asn	att Ile	gaa Glu	cac His 250	aac Asn	agc Ser	aca Thr	aca Thr	tcc Ser 255	acc Thr	ttc Phe	tgt Cys	ggc Gly	acg Thr 260	822
ccg Pro	gag Glu	tat Tyr	ctc Leu	gca Ala 265	cct Pro	gag Glu	gtg Val	ctt Leu	cat His 270	aag Lys	cag Gln	cct Pro	tat Tyr	gac Asp 275	agg Arg	870
act Thr	gtg Val	gac Asp	tgg Trp 280	tgg Trp	tgc Cys	ctg Leu	gga Gly	gct Ala 285	gtc Val	ttg Leu	tat Tyr	gag Glu	atg Met 290	ctg Leu	tat Tyr	918
ggc Gly	ctg Leu	ccg Pro 295	cct Pro	ttt Phe	tat Tyr	agc Ser	cga Arg 300	aac Asn	aca Thr	gct Ala	gaa Glu	atg Met 305	tac Tyr	gac Asp	aac Asn	966

L61882PC.ST25

att ctg aac aag cct ctc cag ctg aaa cca aat	att aca aat tcc gca	1014
Ile Leu Asn Lys Pro Leu Gln Leu Lys Pro Asn	Ile Thr Asn Ser Ala	
310	320	
aga cac ctc ctg gag ggc ctc ctg cag aag gac	agg aca aag cgg ctc	1062
Arg His Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Lys Asp	Arg Thr Lys Arg Leu	
325	330 335 340	
ggg gcc aag gat gac ttc atg gag att aag agt	cat gtc ttc ttc tcc	1110
Gly Ala Lys Asp Asp Phe Met Glu Ile Lys Ser	His Val Phe Phe Ser	
	345 350 355	
tta att aac tgg gat gat ctc att aat aag aag	att act ccc cct ttt	1158
Leu Ile Asn Trp Asp Asp Leu Ile Asn Lys Lys	Ile Thr Pro Pro Phe	
	360 365 370	
aac cca aat gtg agt ggg ccc aac gac cta cgg	cac ttt gac ccc gag	1206
Asn Pro Asn Val Ser Gly Pro Asn Asp Leu Arg	His Phe Asp Pro Glu	
	375 380 385	
ttt acc gaa gag cct gtc ccc aac tcc att ggc	aag tcc cct gac agc	1254
Phe Thr Glu Glu Pro Val Pro Asn Ser Ile Gly	Lys Ser Pro Asp Ser	
	390 395 400	
gtc ctc gtc aca gcc agc gtc aag gaa gct gcc	gag gct ttc cta ggc	1302
Val Leu Val Thr Ala Ser Val Lys Glu Ala Ala	Glu Ala Phe Leu Gly	
	405 410 415 420	
ttt tcc tat gcg cct ccc acg gac tct ttc ctc	tgaaccctgt tagggcttgg	1355
Phe Ser Tyr Ala Pro Pro Thr Asp Ser Phe Leu		
	425 430	
ttttaaagga ttttatgtgt gtttccgaat gttttagtta	gcctttttggt ggagccgcca	1415
gctgacagga catcttaciaa gagaatttgc acatctcttg	aagcttagca atcttattgc	1475
acactgttcg ctggaagctt tttgaagagc acattctcct	cagtgagctc atgaggtttt	1535
cattttttatt cttccttcca acgtggtgct atctctgaaa	cgagcgtttag agtgccgcct	1595
tagacggagg caggagtttc gttagaaagc ggacgctggt	ctaaaaaagg tctcctgcag	1655-
atctgtcttg gctgtgatga cgaatattat gaaatgtgcc	ttttctgaag agattgtggt	1715
agctccaaag cttttcctat cgcagtgttt cagttcttta	ttttcccttg tggatatgct	1775
gtgtgaaccg tcgtgtgagt gtggtatgcc tgatcacaga	tggatttttgt tataagcatc	1835
aatgtgacac ttgcaggaca ctacaacgtg ggacattggt	tgtttcttcc atatttggaa	1895
gataaattta tgtgtagact tttttgtaag atacggttaa	taactaaaat ttattgaaat	1955
ggctcttgcaa tgactcgtat tcagatgctt aaagaaagca	ttgctgctac aaatatattct	2015
attttttagaa agggttttta tggaccaatg ccccagttgt	cagtcagagc cgttggtggt	2075
tttcattggt taaaatgtca cctgtaaaat gggcattatt	tatgtttttt tttttgcatt	2135

L61882PC.ST25

cctgataatt gtatgtattg tataaagaac gtctgtacat tgggttataa cactagtata 2195
 tttaaactta caggcttatt tgtaatgtaa accaccattt taatgtactg taattaacat 2255
 gggttataata cgtacaatcc ttccctcatc ccatcacaca acttttttttg tgtgtgataa 2315
 actgatatttg gtttgcaata aaaccttgaa aaatatatta 2354

<210> 2
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 2

Met Thr Val Lys Thr Glu Ala Ala Lys Gly Thr Leu Thr Tyr Ser Arg
 1 5 10 15

Met Arg Gly Met Val Ala Ile Leu Ile Ala Phe Met Lys Gln Arg Arg
 20 25 30

Met Gly Leu Asn Asp Phe Ile Gln Lys Ile Ala Asn Asn Ser Tyr Ala
 35 40 45

Cys Lys His Pro Glu Val Gln Ser Ile Leu Lys Ile Ser Gln Pro Gln
 50 55 60

Glu Pro Glu Leu Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Pro Ser Pro Ser
 65 70 75 80

Gln Gln Ile Asn Leu Gly Pro Ser Ser Asn Pro His Ala Lys Pro Ser
 85 90 95

Asp Phe His Phe Leu Lys Val Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val
 100 105 110

Leu Leu Ala Arg His Lys Ala Glu Glu Val Phe Tyr Ala Val Lys Val
 115 120 125

Leu Gln Lys Lys Ala Ile Leu Lys Lys Lys Glu Glu Lys His Ile Met
 130 135 140

Ser Glu Arg Asn Val Leu Leu Lys Asn Val Lys His Pro Phe Leu Val
 145 150 155 160

L61882PC.ST25

Gly	Leu	His	Phe	Ser 165	Phe	Gln	Thr	Ala	Asp 170	Lys	Leu	Tyr	Phe	Val 175	Leu	
Asp	Tyr	Ile	Asn 180	Gly	Gly	Glu	Leu	Phe 185	Tyr	His	Leu	Gln	Arg 190	Glu	Arg	
Cys	Phe	Leu 195	Glu	Pro	Arg	Ala	Arg 200	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu 205	Ile	Ala	Ser	
Ala	Leu 210	Gly	Tyr	Leu	His	Ser 215	Leu	Asn	Ile	Val	Tyr 220	Arg	Asp	Leu	Lys	
Pro 225	Glu	Asn	Ile	Leu	Leu 230	Asp	Ser	Gln	Gly	His 235	Ile	Val	Leu	Thr	Asp 240	
Phe	Gly	Leu	Cys	Lys 245	Glu	Asn	Ile	Glu	His 250	Asn	Ser	Thr	Thr	Ser 255	Thr	
Phe	Cys	Gly	Thr 260	Pro	Glu	Tyr	Leu	Ala 265	Pro	Glu	Val	Leu	His 270	Lys	Gln	
Pro	Tyr	Asp 275	Arg	Thr	Val	Asp	Trp 280	Trp	Cys	Leu	Gly	Ala 285	Val	Leu	Tyr	
Glu	Met 290	Leu	Tyr	Gly	Leu	Pro 295	Pro	Phe	Tyr	Ser	Arg 300	Asn	Thr	Ala	Glu	
Met 305	Tyr	Asp	Asn	Ile	Leu 310	Asn	Lys	Pro	Leu	Gln 315	Leu	Lys	Pro	Asn	Ile 320	
Thr	Asn	Ser	Ala	Arg 325	His	Leu	Leu	Glu	Gly 330	Leu	Leu	Gln	Lys	Asp 335	Arg	
Thr	Lys	Arg	Leu 340	Gly	Ala	Lys	Asp	Asp 345	Phe	Met	Glu	Ile	Lys 350	Ser	His	
Val	Phe	Phe 355	Ser	Leu	Ile	Asn	Trp 360	Asp	Asp	Leu	Ile	Asn 365	Lys	Lys	Ile	
Thr 370	Pro	Pro	Phe	Asn	Pro	Asn 375	Val	Ser	Gly	Pro	Asn 380	Asp	Leu	Arg	His	
Phe	Asp	Pro	Glu	Phe	Thr	Glu	Glu	Pro	Val	Pro	Asn	Ser	Ile	Gly	Lys	

L61882PC.ST25

385

390

395

400

Ser Pro Asp Ser Val Leu Val Thr Ala Ser Val Lys Glu Ala Ala Glu
405 410 415

Ala Phe Leu Gly Phe Ser Tyr Ala Pro Pro Thr Asp Ser Phe Leu
420 425 430